

Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente

Thermoresistance of filamentous fungi isolated from aseptically packaged fruit nectars

Autores | Authors

Elisa Helena da Rocha FERREIRA

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
e-mail: elisahelenarocha@gmail.com

Lourdes Maria Pessoa MASSON

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
e-mail: lourdes.masson@ifrj.edu.br

✉ Amauri ROSENTHAL

Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA)
Av. das Américas, 29501, Guaratiba
CEP: 23020-470
Rio de Janeiro/RJ - Brasil
e-mail: arosent@ctaa.embrapa.br

Maria de Lourdes SOUZA

Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA)
e-mail: mlourdes@ctaa.embrapa.br

Luana TASHIMA

Embrapa Agroindústria de Alimentos
lutashima@gmail.com

Pilar Rodriguez de MASSAGUER

Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello
Laboratório de Termobacteriologia (LABOTERMO)
e-mail: pilar.rodriguez@terra.com.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 14/01/2009
Aprovado | Approved: 14/04/2011

Resumo

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a termorresistência dos fungos mais termorresistentes, isolados de néctares de maracujá e abacaxi comerciais pasteurizados, bem como verificar a produção de patulina por esses fungos, quando inoculados em tais néctares. Os fungos mais termorresistentes isolados foram o *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá e o *Byssoschlamys nivea* em néctar de abacaxi. O *B. nivea*, em néctar de abacaxi, mostrou-se mais termorresistente, com base nos valores de $D_{98^{\circ}\text{C}}$ e Z, os quais resultaram em 27 min e 5,4 °C, respectivamente, em comparação com 13,6 min e 5,5 °C encontrados para *B. fulva*, em néctar de maracujá. A pasteurização comumente aplicada pela indústria não se mostrou suficiente para inativação dos fungos isolados. Não houve produção de patulina quando se inocularam os fungos diretamente nos néctares estudados.

Palavras-chave: *Byssoschlamys fulva*; *Byssoschlamys nivea*; Termorresistência; Néctar; Patulina.

Summary

This study aimed at selecting and characterising the thermal resistance of thermally resistant moulds isolated from commercial pasteurised passion fruit and pineapple nectars. It also aimed to verify patulin production by such moulds following their inoculation into the products. The most thermally resistant moulds isolated from passion fruit and pineapple nectars were *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*, respectively. *B. nivea* showed the highest thermal resistance in pineapple nectar based on the $D_{98^{\circ}\text{C}}$ and Z-values of 27.0 min and 5.4 °C, respectively, as compared to the same parameters found for *B. fulva* in passion fruit nectar of 13.6 min and 5.5 °C. The pasteurisation commonly applied by industry was shown to be inadequate to inactivate the isolated moulds. No patulin production was found when the isolated moulds were inoculated directly into the nectars.

Key words: *Byssoschlamys fulva*; *Byssoschlamys nivea*; Heat resistance; Nectar; Patulin.

Termorresistência de fungos filamentosos Isolados de néctares de frutas envasados assepticamente

FERREIRA, E. H. R. et al.

1 Introdução

Os alimentos mais susceptíveis à deterioração por fungos termorresistentes são frutas e produtos de frutas, como sucos, purês, néctares, polpas, concentrados, frutas enlatadas e alimentos infantis à base de frutas. Dentre os vários tipos de frutas, aquelas que são colhidas diretamente do solo ou que estão próximas dele, como morango, ameixa, maracujá, uva, abacaxi, pêssego e maçã, são as mais afetadas pela deterioração por fungos termorresistentes (HOCKING e PITT, 2001; HOUBRAKEN et al., 2006).

No Brasil, Aragão (1989) isolou fungos dos gêneros *Byssoschlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium* de polpas de frutas e diferentes sucos. Rosenthal et al. (2002) verificaram a contaminação por fungos termorresistentes, principalmente do gênero *Byssoschlamys*, em sucos de abacaxi termicamente tratados. Welke et al. (2009) e Salomão et al. (2008) verificaram a presença de fungos do gênero *Byssoschlamys* spp. em suco de maçã, e Mattietto et al. (2007) detectaram tal presença em néctar misto de cajá e umbu.

A maioria dos fungos filamentosos possui limitada resistência térmica e facilmente destruídas pela aplicação de calor. Entretanto, algumas espécies que possuem a característica de produzir ascósporos (reprodução sexuada), como *Byssoschlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces*, entre outras, demonstram uma alta resistência térmica (HOCKING e PITT, 1984; JESENKÁ et al., 1993; PIECKOVÁ et al., 1994; TOURNAS, 1994; KING JUNIOR, 1997; RAJASHEKHARA et al., 2000; VALÉK e PIECKOVÁ, 2001; SALOMÃO et al., 2007; SLOGO e ARAGÃO, 2007; SANT'ANA et al., 2009).

A pasteurização normalmente aplicada aos produtos de frutas ativa os ascósporos dormentes, que germinam e permitem o crescimento dos fungos termorresistentes (BEUCHAT, 1986; ENGEL e TEUBA, 2001; SLOGO e ARAGÃO, 2006). Por sobreviverem aos tratamentos térmicos utilizados no processamento de frutas, esses fungos podem crescer e deteriorar os produtos estocados à temperatura ambiente, o que pode resultar em grandes perdas econômicas. As espécies de *Byssoschlamys* são capazes de crescer fermentando em baixos níveis de oxigênio, produzindo pectinases, resultando em uma desintegração da estrutura da fruta, além de serem potencialmente produtoras de patulina (HOCKING e PITT, 2001).

A patulina é a principal micotoxina associada às espécies de *Byssoschlamys* e pode apresentar efeitos neurotóxicos, imunotóxicos e genotóxicos em animais. Ocasionalmente, também, distúrbios gastrointestinais, sendo

um possível agente carcinógeno e mutagênico; pode, ainda, em doses subletais, causar hemorragias no trato digestivo. A contaminação por esse metabólito tóxico tem sido relatada principalmente em sucos de maçã em níveis muito variáveis, dependendo do país e das práticas de processamento (BURDA, 1992; SYLOS e RODRIGUES-AMAYA, 1999; PRADO et al., 2000; RODRIGUES-AMAYA e SABINA, 2002; HOUBRAKEN et al., 2006; IHA et al., 2008). A Organização Mundial da Saúde e o *Codex Alimentarius* estabeleceram um limite de 50 µg.L⁻¹ de patulina em sucos de maçã e bebidas prontas contendo suco de maçã (WHO, 1998). Quando o limite máximo diário de patulina é excedido em sucos e outros produtos de frutas, há um risco potencial para o homem, principalmente crianças e imunodeficientes (SELMANOGLU e ARZU KOÇKAYA, 2004).

Os objetivos deste trabalho são selecionar e avaliar os parâmetros cinéticos de inativação, por meio dos parâmetros D e Z, dos fungos filamentosos termorresistentes isolados dos néctares de maracujá e abacaxi, comparar com o tratamento dado pela indústria e também verificar a produção da micotoxina patulina por esses fungos nos respectivos néctares.

2 Material e Métodos

2.1 Amostras de néctar

As amostras de néctares de abacaxi e maracujá utilizadas para isolamento dos fungos filamentosos foram provenientes de quatro lotes de produção de uma indústria processadora de néctares tropicais. As amostras desse produto empregadas para a caracterização térmica dos fungos *Byssoschlamys fulva* e *Byssoschlamys nivea* foram obtidas em mercado local.

2.2 Isolamento e estocagem dos fungos filamentosos termorresistentes

Para enumeração dos fungos termorresistentes, utilizou-se o método de plaqueamento em profundidade (PITT e HOCKING, 1985).

Foram transferidos assepticamente 100 mL de amostra dos néctares para quatro tubos com tampa rosqueável 25 x 200 mm, com 25 mL em cada tubo, sendo submetidos a um tratamento térmico de 80 °C em banho termostático por 30 min, para eliminar células vegetativas e ativar os ascósporos; posteriormente, foram resfriados em banho de gelo. Seus volumes foram unidos em um único Erlenmeyer de capacidade de 250 mL em câmara de fluxo laminar, adicionando-se 100 mL de Agar Batata Dextrose em concentração dupla, 50 mg.L⁻¹ de rosa de bengala, 4 mg.L⁻¹ de cloranfenicol e acidificando-se com solução de ácido tartárico 10% m/v (pH final 3,5).

Termorresistência de fungos filamentosos Isolados de néctares de frutas envasados assepticamente

FERREIRA, E. H. R. et al.

O meio foi distribuído em oito placas de Petri de 90 mm de diâmetro, tendo cada uma um volume aproximado de 25 mL. Após solidificação do meio, as placas foram vedadas com filme PVC para evitar ressecamento e incubadas a 30 °C por 30 dias. Após este período de incubação, cada colônia de fungo que se desenvolveu foi transferida para placas contendo 25 mL de Agar Batata Dextrose (pH 5,6, DIFCO) para o seu isolamento. As placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias.

2.3 Preparo da suspensão de ascósporos

Garrafas de Roux contendo 200 mL de Ágar Extrato de Malte (PITT, 1979) foram inoculadas com 0,5 mL de suspensão previamente preparada de cada cepa de fungo filamentosos. Para a preparação dessa suspensão, transferiu-se com uma alça em "L" estéril um fragmento de fungo para um tubo de tampa rosqueável 13 x 100 mm, contendo 2 mL de solução 0,05% de Tween 80 (solução dispersante), seguido de agitação.

Após 30 dias de incubação a 30 °C, foram transferidos para cada garrafa 25 mL de água destilada estéril e, com auxílio de uma bagueta estéril, fez-se a raspagem da superfície de crescimento do fungo. A suspensão foi filtrada em um sistema estéril de funil e camadas de gaze, colocada em garrafas com tampa rosqueável e armazenada sob refrigeração a 4 °C.

2.4 Seleção do isolado mais resistente

A suspensão de ascósporos, com um mês de idade, de cada isolado codificado, foi submetida a vários tratamentos térmicos. A Tabela 1 mostra os tratamentos mínimo e máximo aplicados aos néctares para definir o isolado mais resistente. Para cada isolado, foi utilizado tubo com tampa rosqueável 13 x 150 mm com 9 mL de néctar, previamente esterilizado, sendo cada tubo inoculado com 1 mL da suspensão de ascósporos. Após o tratamento térmico, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo. O conteúdo de cada tubo foi transferido para placa de Petri, recebendo aproximadamente 15 mL de Ágar Batata Dextrose em concentração dupla, seguido de homogeneização. Após solidificação da mistura, as placas foram incubadas a 30 °C por 7 a 21 dias. Os tratamentos foram feitos em duas replicatas. O crescimento do fungo após este período foi indicativo de resistência ao tratamento térmico.

Tabela 1. Intervalos de choques térmicos aplicados aos néctares.

Néctar	Mínimo	Máximo
Maracujá	80 °C / 20 min	103 °C / 30 min
Abacaxi	103 °C / 3 min	103 °C / 10 min

2.5 Ensaio com a cepa do fungo termorresistente

2.5.1 Produção e coleta de ascósporos

A cepa do fungo termorresistente foi inoculada em cinco garrafas de Roux contendo 200 mL de Ágar Extrato de Malte e incubada a 30 °C, por 30 dias. Após o período de incubação, os ascósporos de cada garrafa foram coletados utilizando-se 30 mL de água estéril. A suspensão resultante foi filtrada em sistema estéril de funil revestido com gaze para remover os fragmentos de hifas. Estes fragmentos foram submetidos a ultrassom, entre 0 e 4 °C, com incrementos de 1 min até a obtenção de ascósporos livres, de forma que a concentração final, contada em Câmara de Neubauer, fosse aproximadamente 10^7 ascósporos.mL⁻¹.

2.5.2 Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos

Para determinar as condições ótimas de ativação dos ascósporos, foram empregadas temperaturas de 85 °C e tempos de 5, 10, 15, 20 e 25 min. A combinação 'tempo e temperatura' que obteve a maior recuperação dos ascósporos foi considerada a condição ótima para ativação dos mesmos. Tubos TDT estéreis (duplicata) foram preenchidos com 1,8 mL de cada néctar estéril estudado e inoculados com 0,2 mL da suspensão de ascósporos preparada, seguido de homogeneização. Os tubos TDT foram selados em maçarico O₂/ acetileno e colocados em banho termostático ajustado a 85 °C para receber os tratamentos térmicos. O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente. Em cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram retirados do banho e resfriados em banho de gelo imediatamente. Seguidamente, os tubos foram abertos assepticamente e, após diluições seriadas, fez-se o plaqueamento em profundidade em Ágar Extrato de Malte (duplicata).

As placas foram incubadas a 30 °C e as leituras feitas a partir do terceiro até o sétimo dia de incubação. A contagem foi expressa em ascósporos.mL⁻¹.

2.6 Cinética de inativação dos ascósporo de *Byssochlamys* spp.

Para o ensaio da cinética de inativação, foram utilizadas temperaturas distintas para os diferentes néctares. Estes tratamentos térmicos foram próximos aos realizados pela indústria. As variações de temperatura foram baseadas no valor Z estimado ($Z = 5$ °C) (KOTZEKIDOU, 1997; SPLITTSTOESSER et al., 1989) e no limite de sobrevivência dos fungos. O tempo de permanência em cada temperatura foi calculado e baseou-se em "curva fantasma" (Equação 1). O tratamento térmico teve como objetivo uma redução

Termorresistência de fungos filamentosos Isolados de néctares de frutas envasados assepticamente

FERREIRA, E. H. R. et al.

de cinco ciclos logarítmicos, comumente utilizados na pasteurização de sucos e néctares.

$$\text{LogD}_2 - \text{LogD}_1 = -\frac{1}{Z}(T_2 - T_1) \quad (1)$$

Foi utilizado o método do TDT selado (PITT, 1979). Os tubos foram preparados conforme item 2.5.2 e obtiveram concentração de 10^6 ascósporos. mL⁻¹. Em seguida, os tubos foram colocados em banho termostático, ajustados às temperaturas definidas e o tratamento térmico foi efetuado considerando-se o tempo de subida de cada temperatura. Após tratamento térmico, os tubos foram resfriados e abertos assepticamente. Foram realizadas cinco diluições sucessivas e posteriores plaqueamentos em profundidade em Ágar Extrato de Malte (duplicata). Depois do meio homogeneizado e solidificado, as placas foram incubadas a 30 °C. A leitura do número de ascósporos formados foi feita do terceiro até o sétimo dia de incubação, e expressa em ascósporos.mL⁻¹.

Com o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento, foram construídas as curvas de sobrevivência térmica para cada temperatura e, posteriormente, a curva de destruição térmica. Como as curvas não apresentaram comportamento logarítmico, utilizou-se o método de linearização de Alderton e Snell (1970), determinando-se os parâmetros equivalentes D e Z.

2.7 Avaliação da produção de patulina

Foram envasados 200 mL de cada néctar em Erlenmeyer estéril e inoculados com 1 mL da suspensão dos respectivos fungos. Os néctares com as culturas foram incubados em BOD a 25 °C, por sete dias. Os néctares controle foram inoculados com 1 mL de água e disco de micélio somente com o meio de cultura. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

As análises de patulina nos néctares foram realizadas segundo o método AOAC (TRUCKSESS, 2000), utilizando equipamento de CLAE da Waters [bomba 600, injetor 717, detector UV 2487 ($\lambda = 276$ nm)] e coluna a X-Terra RP18 (4,6 x 250 mm) de 5 μ m, fase móvel acetonitrila:água (10:90) e fluxo de 0,8 mL.min⁻¹.

3 Resultados e Discussão

3.1 Fungos isolados de cada néctar e seleção do mais resistente

Foram obtidos 21 e 19 isolados fúngicos a partir das amostras de néctares de maracujá e abacaxi, respectivamente. Os fungos isolados foram submetidos a diferentes tratamentos térmicos para se definir qual o mais termorresistente (Item 2.4). Observa-se pela Tabela 2 que os fungos com maior termorresistência

Tabela 2. Limite de sobrevivência dos fungos filamentosos nos néctares de fruta.

Néctar	Fungo termorresistente	Condições limites
Maracujá	<i>Byssoschlamys fulva</i>	103 °C / 15 min
Abacaxi	<i>Byssoschlamys nivea</i>	103 °C / 7 min

sobreviveram até o limite de 103 °C/15 min no néctar de maracujá e 103 °C/7 min, no de abacaxi. Tratamentos térmicos superiores não permitiram qualquer crescimento fúngico. Estes fungos foram analisados macro e microscopicamente, segundo Pitt e Hocking (1985), apresentando estruturas semelhantes aos fungos *Byssoschlamys fulva* (néctar de maracujá) e *Byssoschlamys nivea* (néctar de abacaxi).

3.2 Ativação de ascósporos dos fungos termorresistentes

Uma vez que os ascósporos de fungos termorresistentes são formados, estes desenvolvem uma dormência com o tempo, que pode ser quebrada por um tratamento térmico subletal chamado ativação, permitindo a germinação e o crescimento em condições favoráveis (SPLITTSTOESSER et al., 1993).

A Figura 1 mostra as curvas de ativação do *Byssoschlamys fulva* e do *Byssoschlamys nivea*. Verifica-se que o tempo de ativação ótima nos dois néctares foi de 10 min a 85 °C. É possível perceber, também, que com este tratamento podem-se ativar 82,1% e 88,3% dos ascósporos nos néctares de maracujá e abacaxi, respectivamente. Essas porcentagens de ativação foram calculadas baseando-se na contagem inicial (N_0) e na contagem final após o tratamento térmico de ativação de 10 min a 85 °C (N_t), sendo: para néctar de maracujá, $N_0 = 5,6 \cdot 10^6$ ascósporos.mL⁻¹ e $N_t = 4,6 \cdot 10^6$ ascósporos.mL⁻¹; para néctar de abacaxi, $N_0 = 9,4 \cdot 10^6$ ascósporos.mL⁻¹ e $N_t = 8,3 \cdot 10^6$ ascósporos.mL⁻¹.

3.3 Resistência térmica dos fungos filamentosos

A curva de inativação térmica de fungos termorresistentes não segue um comportamento logarítmico como na maioria dos ascósporos bacterianos, conforme pode ser visto nas Figuras 2 e 3. Optou-se pelo método de Alderton e Snell (1970) para linearização das curvas, conforme realizado por King Junior e Whitehand (1990), Kotzekidou (1997), Rajashekhara et al. (1996, 2000), Salomão et al. (2004, 2007), Slongo et al. (2005) e Slongo e Aragão (2007), e comprovado como sendo o mais adequado para o cálculo dos parâmetros cinéticos.

As Figuras 2 e 3 mostram a curva de sobreviventes dos ascósporos ativados de *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá e *Byssoschlamys nivea* em néctar de

Termorresistência de fungos filamentosos Isolados de néctares de frutas envasados assepticamente

FERREIRA, E. H. R. et al.

abacaxi. Observou-se nas temperaturas mais baixas o aparecimento de “ombros” seguidos de taxa de morte acelerada. Estes “ombros” tornam inapropriado o cálculo dos tradicionais valores “D” e “Z”, utilizando-se o método de linearização de Alderton e Snell (1970) para a obtenção de parâmetros cinéticos equivalentes.

Os “ombros” podem ser observados nas curvas a 98 °C e 95 °C nos néctares de maracujá e abacaxi,

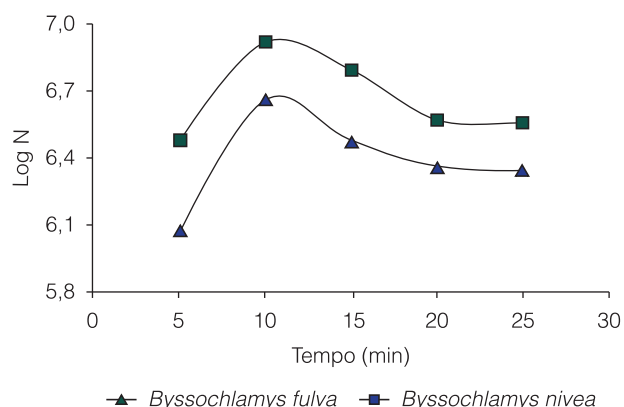


Figura 1. Curvas de ativação dos ascósporos de *Byssoschlamys fulva* e *Byssoschlamys nivea* em néctares de maracujá e abacaxi, respectivamente, a 85 °C.

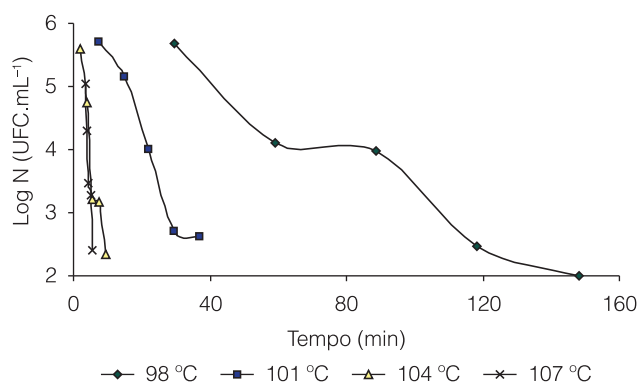


Figura 2. Curvas experimentais de sobrevivência dos ascósporos de *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá.

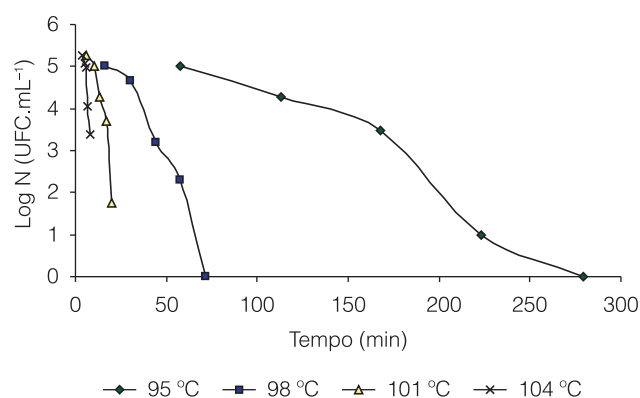


Figura 3. Curvas experimentais de sobrevivência dos ascósporos de *Byssoschlamys nivea* em néctar de abacaxi.

respectivamente. Com o aumento da temperatura de tratamento, as curvas tornam-se praticamente lineares.

As curvas de sobreviventes foram linearizadas segundo Alderton e Snell (1970), possibilitando o cálculo dos parâmetros cinéticos equivalentes a D ($1/k$) e Z (Z^*). Na equação proposta por esse método, $(\log N_0 - \log N)^a = kt + C$, N_0 e N representam os números inicial e final de ascósporos.mL⁻¹, respectivamente. O tempo de aquecimento, em min, em dada temperatura, é representado por “t”; a constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada) por “k”, e o intercepto da curva linearizada por “C”. O expoente de linearização “a” pode ser obtido pelo inverso da inclinação do gráfico: $\log (\log N_0 - \log N)$ versus $\log t$. Este valor, calculado na menor temperatura de tratamento térmico, pode ser aplicado na linearização das curvas obtidas de tratamentos mais severos. Dessa forma, se a taxa de morte seguir a equação linearizada e não houver erros experimentais (valor de C igual a zero), o valor de $1/k$ deriva da equação $1/k = t / (\log N_0 - \log N)^a$, similar à equação da curva logarítmica $D = t_0 / (\log N_0 - \log N)$, quando “a” é igual a 1. Por analogia entre as duas últimas equações, o parâmetro “ $1/k$ ” equivale a “D”. O parâmetro equivalente a “Z” é Z^* , que pode ser obtido pelo negativo do inverso do coeficiente angular da curva ($-\log k$) versus temperatura (°C).

Os expoentes “a” foram calculados através da Figura 4 e tiveram valores de 1.0928 ($R^2 = 0.9209$) para o *B. fulva* em néctar de maracujá e 0.9722 ($R^2 = 0.9563$) para o *B. nivea* em néctar de abacaxi.

Com os expoentes “a” determinados, as curvas foram linearizadas conforme as Figuras 5 e 6 para o *B. fulva* em néctar de maracujá e o *B. nivea* em néctar de abacaxi. Os valores de resistência térmica (valor D) e os coeficientes de correlação (R^2) para os respectivos fungos foram calculados a partir das equações das curvas linearizadas e encontram-se na Tabela 3.

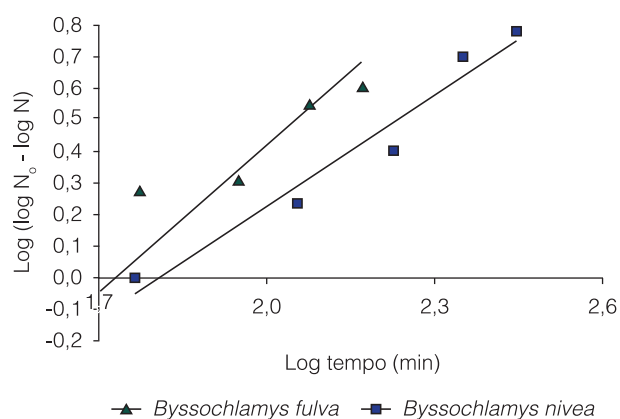


Figura 4. Curvas para determinação do expoente “a” para o *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá a 98 °C e para o *Byssoschlamys nivea* em néctar de abacaxi a 95 °C.

Termorresistência de fungos filamentosos Isolados de néctares de frutas envasados assepticamente

FERREIRA, E. H. R. et al.

A Tabela 3 mostra que os valores de D para o *B. fulva* em néctar de maracujá foram 27; 7,2; 2 e 0,6 min para as temperaturas de 98, 101, 104 e 107 °C, respectivamente, enquanto para o *B. nivea* em néctar de abacaxi, foram: $D_{95\text{ °C}}=55,2$ min; $D_{98\text{ °C}}=13,6$ min; $D_{101\text{ °C}}=3,5$ min; $D_{104\text{ °C}}=0,9$ min. Observa-se nos tratamentos com mesma temperatura (98, 101 e 104 °C) que o *Byssoschlamys nivea* em néctar de abacaxi tem o tempo

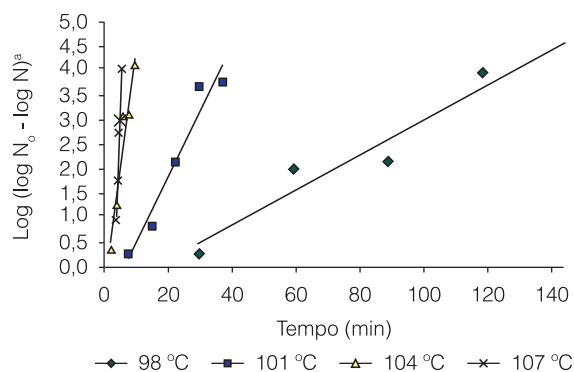


Figura 5. Curva de linearização (ALDERTON e SNELL, 1970) para o *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá.

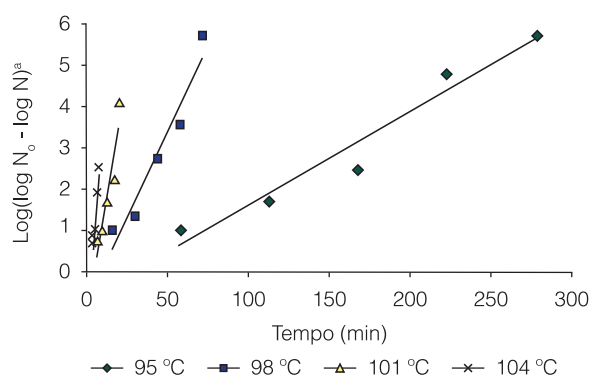


Figura 6. Curva de linearização (ALDERTON e SNELL, 1970) para o *Byssoschlamys nivea* em néctar de abacaxi.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos obtidos após linearização de Alderton e Snell (1970) para os fungos *B. fulva* e *B. nivea* em néctar de maracujá e abacaxi, respectivamente.

<i>Byssoschlamys fulva</i> em néctar de maracujá		
Temperatura (°C)	Valor D (1/k)	R ²
98	27 min	0.9523
101	7.2 min	0.9481
104	2.0 min	0.9368
107	0.6 min	0.9714
<i>Byssoschlamys nivea</i> em néctar de abacaxi		
Temperatura (°C)	Valor D (1/k)	R ²
95	55.2 min	0.9522
98	13.6 min	0.9416
101	3.5 min	0.8634
104	0.9 min	0.8985

de redução decimal maior que o *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá, demonstrando maior termorresistência e necessidade de tratamento mais severo para sua inativação. Slongo e Aragão (2007) também observaram maior termorresistência de *Byssoschlamys nivea* quando comparado com *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi: o primeiro apresenta um $D_{85\text{ °C}}=45$ min, enquanto o segundo, 30 min. Já Kotzekidou (1997) verificou em pasta de tomate um D a 90 °C de 1,5; 8,1 e 6,6 min para *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* e *Neosartorya fischeri*, respectivamente, demonstrando, neste caso, uma maior termorresistência do *B. fulva*. Os resultados foram bem diferentes dos encontrados por San'Ana et al. (2009) que, pelo modelo de Weibull, determinaram um δ (parâmetro semelhante a D) a 95 °C de 1,81 min para o *B. fulva* em suco de maçã clarificado.

A Figura 7 apresenta o gráfico (-Log k) versus temperatura para os ascósporos de *B. fulva* e *B. nivea* em néctares de maracujá e abacaxi. Os valores equivalentes a Z (Z*) são 5,4 °C (R² = 0,9996) e 5,5 °C (R² = 0,9999) para o *B. fulva* e o *B. nivea*, respectivamente, diferentes do encontrado por Slongo e Aragão (2007), que verificaram um Z de 4,5 min para o *B. nivea* em suco de abacaxi. Porém, ambos encontram-se dentro da faixa de valores de Z citados por Tournas (1994), que afirma que o Z para fungos filamentosos termorresistentes varia entre 4 e 7 °C.

3.4 Avaliação do tratamento térmico aplicado pela indústria

O tratamento térmico aplicado pela indústria objetiva uma redução mínima característica de pasteurização de cinco ciclos logarítmicos ($F = 5D$), cujas temperaturas e tempos de retenção estão na Tabela 4. Nesta, pode-se observar também a diferença dos tratamentos dado pela indústria e o necessário para inativação do fungo mais resistente. Sant'Ana et al. (2009) sugerem que a sobrevivência de fungos filamentosos termorresistentes

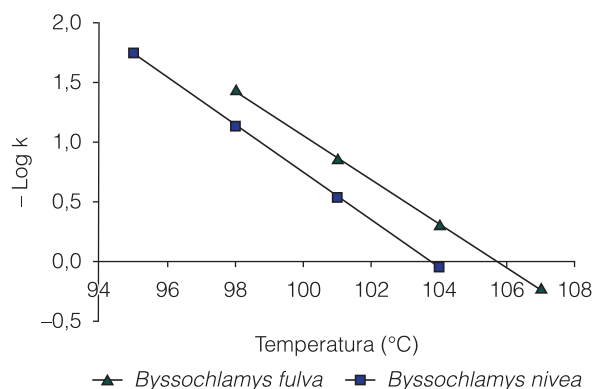


Figura 7. Determinação de Z* para *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá e para *Byssoschlamys nivea* em néctar de abacaxi.

Termorresistência de fungos filamentosos Isolados de néctares de frutas envasados assepticamente

FERREIRA, E. H. R. et al.

Tabela 4. Tabela comparativa do tratamento térmico aplicado pela indústria e o necessário para a inativação dos fungos filamentosos termorresistentes.

Néctar	Parâmetros cinéticos	Tratamento térmico dado pela indústria	Tratamento térmico para inativação do fungo termorresistente
		Tempo de retenção (s)	Tempo de retenção (min)
Maracujá (<i>B. fulva</i>)	D _{98 °C}	6	27
	F _{98 °C}	30	135
Abacaxi (<i>B. nivea</i>)	D _{98 °C}	6	13,6
	F _{98 °C}	30	68

na indústria é consequência da variação de temperatura durante o tratamento térmico. Variações de 2 °C podem levar o valor D de 0,16 min para tempos maiores que 4,78 min, não garantindo a segurança microbiológica do produto em relação aos fungos termorresistentes.

Os tratamentos industriais aplicados nos néctares de maracujá e abacaxi são, respectivamente, 270 e 136 vezes menores que os necessários para a inativação dos fungos *Byssoschlamys fulva* e *Byssoschlamys nivea*. Este resultado já era esperado, pois é conhecido que os fungos do gênero *Byssoschlamys* spp. são extremamente termorresistentes.

3.5 Avaliação da produção de patulina

Não foi detectada a presença de patulina nos néctares de maracujá e abacaxi quando inoculados com ascósporos de *Byssoschlamys nivea* e *Byssoschlamys fulva*, respectivamente.

4 Conclusões

Observou-se que os valores D_{98 °C} e Z para o fungo *Byssoschlamys fulva* em néctar de maracujá são 27 min e 5,4 °C, e para o *Byssoschlamys nivea* em néctar de abacaxi são 13,6 min e 5,5 °C. Dessa maneira, o fungo *B. nivea* em néctar de abacaxi mostrou-se mais termorresistente que o *B. fulva* em néctar de maracujá. Em nenhuma amostra dos néctares foi detectada a micotoxina patulina.

Os fungos *B. fulva* e *B. nivea* revelaram-se extremamente termorresistentes e o tratamento térmico efetuado pela indústria mostrou-se insuficiente para garantir a inativação destes fungos.

Referências

ALDERTON, J.; SNELL, N. Chemical states of bacterial spores: heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. **Applied Microbiology**, Washington, v. 19, n. 4, p. 572-656, 1970.

ARAGÃO, G. M. F. **Identificação e Determinação da Resistência Térmica de Fungos Filamentosos Termorresistentes Isolados de Polpa de Morango**. 1989. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BEUCHAT, L. R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, Malden, v. 51, n. 6, p. 1506-1510, 1986. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb13846.x>

BURDA, K. A. Incidence of patulin in apple, pear and mixed fruit products marketed in New South Wales. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 10, p. 796-798, 1992.

ENGEL, G.; TEUBER, M. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 2-3, p. 225-234, 1991. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90073-X](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(91)90073-X)

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Food spoilage fungi. II. Heat resistance fungi. **CSIRO Food Research Quarterly**, Melbourne, v. 44, n. 4, p. 73-82, 1984.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Moulds. In : MOIR, C.J.; ANDREW-KABILAFKAS, C.; ARNOLD, G.; COX, B.M.; HOCKING, A.D.; JENSON, I. **Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnosis**. Australia: AIFST, 2001. p. 361-381.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Byssoschlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. **Advances in Food Mycology**, New York, v. 571, n. 3, p. 211-224, 2006. PMID:16408604. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-28391-9_14

IHA, M. H.; SABINO, M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 417-422, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.001>

JESENKÁ, Z.; PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D. Heat resistance of fungi from soil. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 187-192, 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90076-S](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(93)90076-S)

KING JUNIOR, A. D. Heat resistance of *Talaromyces flavus* ascospores as determined by two phase slug flow heat exchanger. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 147-151, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01213-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01213-5)

KING JUNIOR, A. D.; WHITEHAND, L. C. Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition. **Journal of Food Science**, Malden, v. 55, n. 3, p. 830-836, 1990. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb05241.x>

Termorresistência de fungos filamentosos Isolados de néctares de frutas envasados assepticamenteFERREIRA, E. H. R. *et al.*

- KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, Malden, v. 62, n. 2, p. 410-412/437, 1997.
- MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Estabilidade do néctar misto de cajá e umbú. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 456-463, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000300006>
- PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENKÁ, Z. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 4, p-297-299, 1994.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985. 413p.
- PITT, J. L. **The genus *Penicillium* and its Teleomorphic States** *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press, 1979. 634p.
- PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; CUNHA, M. R.; GOMIDES, M. F.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T.; BARROSO, R. E. Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 59, n. 1-2, p. 21-25, 2000.
- RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S. Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied Bacteriology**, Malden, v. 81, n. 3, p. 337-340, 1996.
- RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. **Food Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 269-275, 2000. <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1999.0312>
- RODRIGUES-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2002.
- ROSENTHAL, A.; GUERRA FILHO, D.; XAVIER, A.; DUARTE, S. Fungos filamentosos termorresistentes em linha de suco de abacaxi envasado assepticamente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2004, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 28.
- SALOMÃO, B. C. M.; COSTA, C. A.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Influência de diferentes pH do meio de aquecimento na resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado do processo produtivo de néctar de maçã. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 1, p. 7-10, 2004.
- SALOMÃO, B. M. C.; MASSAGUER, P.; ARAGÃO, G. M. C. Isolamento e seleção de fungos termorresistentes em etapas do processo produtivo de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 116-121, 2008.
- SALOMÃO, B. C. M.; SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. **LWT – Food science and Technology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 676-680, 2007.
- SANT'ANA, A. S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 107, n. 1, p. 197-209, 2009. PMID:19298507. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04195.x>
- SELMANOGLU, G.; ARZU KOÇKAYA, E. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 721-727, 2004. PMID:15046817. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2003.12.007>
- SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 312-316, 2006.
- SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. Avaliação da resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 217-224, 2007.
- SLONGO, A. P.; MIORELLI, S.; ARAGÃO, G. M. F. Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 4, p. 377-387, 2005.
- SYLOS, C. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food additives & Contaminants**, London, v. 16, n. 2, p. 71-74, 1999.
- SPLITTSTOESSER, D. F.; LAMMERS, J. M.; DOWNING, D. L.; CHUREY, J. J. Heat resistance of *Eurotium herbariorum*, a xerophilic mould. **Journal of Food Science**, Malden, v. 54, n. 3, p. 683-685, 1989.
- SPLITTSTOESSER, D. F.; NIELSEN, P. V.; CHUREY, J. J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya fischeri*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, p. 599-603, 1993.
- TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 20, n. 4, p. 243-263, 1994. PMID:7857517. <http://dx.doi.org/10.3109/10408419409113558>
- TRUCKSESS, M. W. Natural Toxins. In: HOROWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000. cap. 49. p. 41.
- VALÉK, L.; PIECKOVÁ, E. Growth modeling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 63, n. 1-2, p-11-17, 2001.
- WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTONI, H. A.; NOLL, I. B. Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, II SSA, p. 78-83, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO; EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES – JECFA. **Position paper on patulin (prepared by France)**. 30. session. Hague, Netherlands, 1998.